

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-231416

(43)Date of publication of application : 10.09.1996

(51)Int.Cl.

A61K 38/22

A61K 38/22

(21)Application number : 07-037367

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM CORP

(22)Date of filing : 24.02.1995

(72)Inventor : ISHIDA MARI
MITSUYA MASAYUKI**(54) TREATING AGENT FOR THROMBOSIS****(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain a drug which is useful for prophylaxis or treatment of thrombosis, for example, cardiac infarction and cerebral thrombosis, since the drug promotes proliferation of vascular endothelial cells and t-PA production.

CONSTITUTION: This prophylactic or treating drug for thrombosis contains, as an active ingredient, hepatic parenchyma cell-growing factor, for example, 1) having an estimated molecular weight of about 76-92K according to the SDS-PAGE; 2) having an activity of proliferating hepatic parenchyma cells; 3) inactivating the activity by heat treatment at 80° C for 10 minutes; 4) inactivating the activity by digestive treatment with trypsin or with chymotrypsin and 5) having strong affinity of heparin.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.11.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 18.01.2006

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(51)Int.Cl.⁹識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
A 6 1 K 38/22 A C B A 6 1 K 37/24 A C B
A B N A B N

審査請求 未請求 請求項の数4 O L （全 5 頁）

(21)出願番号	特願平7-37367	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成7年(1995)2月24日	(72)発明者	石田 満理 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
		(72)発明者	三津家 正之 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 今村 正純 （外1名）

(54)【発明の名称】 血栓症治療剤

(57)【要約】

【構成】 肝実質細胞増殖因子（例えば 1)SDS-PAGE による推定分子量が約76～92K であり；2)肝実質細胞を増殖させる活性を有し；3)80℃、10分間の加熱処理により上記活性が失活し；4)トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活し；5)ヘパリンに対して強い親和性を有するもの）を有効成分として含む血栓症の予防・治療薬。

【効果】 有効成分であるHGF は血管内皮細胞の増殖とt-PA産生を促進するので心筋梗塞や脳血栓などの血栓症の予防・治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 肝実質細胞増殖因子を有効成分として含む血栓症の予防・治療剤。

【請求項 2】 肝実質細胞増殖因子が下記の理化学的性質：

- 1) SDS-PAGE（非還元条件下）による推定分子量が約 76,000～92,000 であり；
 - 2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有し；
 - 3) 80℃、10 分間の加熱処理により上記活性が失活し；
 - 4) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活し；
 - 5) ヘパリンに対して強い親和性を有する
- を示す請求項 1 に記載の予防・治療剤。

【請求項 3】 肝実質細胞増殖因子を有効成分として含む血管内皮細胞の障害を伴う疾患の予防・治療剤。

【請求項 4】 肝実質細胞増殖因子が下記の理化学的性質：

- 1) SDS-PAGE（非還元条件下）による推定分子量が約 76,000～92,000 であり；
 - 2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有し；
 - 3) 80℃、10 分間の加熱処理により上記活性が失活し；
 - 4) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活し；
 - 5) ヘパリンに対して強い親和性を有する
- を示す請求項 3 に記載の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は血栓症及び血管内皮細胞の障害を伴う疾患の予防及び／又は治療剤に関するものである。より詳しくは、本発明は肝実質細胞増殖因子を有効成分として含み、各種血栓症の予防や治療、並びに血管内皮細胞の障害を伴う腎炎などの疾患の予防や治療に有用な医薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 生体では、出血に伴ってフィブリン（凝固血栓）が形成されて止血を行う機構と、形成されたフィブリンが溶解（血栓溶解又はフィブリン溶解）して血管内の血液流動性が回復する機構が備わっており、両者の調和によって完全な止血機構が維持されている。このように血液の凝固が完了した後に凝固塊が溶解して再び血液流動性を獲得する現象を繊維素溶解現象（線溶）と呼ぶ。

【0003】 このような止血過程で形成される凝固血栓は、必要以上に血管内に残存すると生体にとっては異物となり、血管の狭窄や血栓形成の増大、あるいはフィブリンの器質化による動脈硬化などの病因となる。このような理由から、病的状態において過大に形成された血栓に対して、積極的にフィブリンを溶解する血栓溶解療法が行われており、従来よりプラスミノゲンアクティベーター(PA)としてのウロキナーゼ(UK)、ストレプトキナ

ーゼ(SK)、及び組織プラスミノゲンアクティベーター(t-PA)などの薬剤が治療に用いられている。しかしながら、これらの薬剤はいずれも一過性の作用を有するにすぎず、また、生理的濃度よりはるかに高濃度の薬剤を静脈内投与するため、出血傾向を引き起こすという問題を有していた。

【0004】 一方、ヒト肝実質細胞増殖因子（以下、本明細書において「hHGF」と略記する場合があり、単に肝実質細胞増殖因子を表す場合は「HGF」と略記する場合がある）は、初代培養肝細胞の増殖を促進させるヒト由来蛋白性因子として、劇症肝炎患者血漿から初めて分離された（特開昭63-22526号公報）。その後、hHGF蛋白質をコードする遺伝子(cDNA)及びアミノ酸配列（特開平3-72883号公報）、組換えhHGFの生産方法（特開平3-285693号公報）が報告されている。このような組換えヒトHGF(以下、本明細書において「rhHGF」と略記する場合がある）は、生体外(J. Clin. Invest., 87, pp.1853-1857, 1991)、及び生体内(Jpn. J. Pharmacol., 59, suppl. 1, 137, 1992)において肝実質細胞の増殖及び機能を促進する作用を有している。

【0005】 さらに、HGFの標的細胞や標的組織が広く検索されており、HGFが肝細胞以外の種々の上皮細胞（尿細管上皮、肺上皮、胆管上皮、又は胃上皮等）や線維芽細胞、リンパ球系細胞等に反応して、その増殖や運動性を変化させることが報告されている(Mitsubishi Kasei R&D Review, 7, pp.16-24, 1993)。また、これらHGF標的細胞上のレセプター分子として、癌原遺伝子c-met産物が機能していることも明らかにされている(Science, 251, pp.802-804, 1991)。しかしながら、HGFの血管内皮細胞に対する生理作用は未だ知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】 本発明の目的は血栓症の予防及び／又は治療剤を提供することにある。また、血栓の形成が起因となる疾患の予防及び／又は治療に有用な医薬を提供することも本発明の目的である。本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、HGFが血管内皮細胞におけるt-PAの産生(Tromb. Haemost., 43, pp.77-89, 1980; Semi. Tromb. Hemost., 10, pp.24-41, 1984)を促進すること、並びに、HGFが血管内壁の抗血栓性の維持に重要な役割を果たしている血管内皮細胞の増殖を促進することを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

【0007】 すなわち本発明は、肝実質細胞増殖因子を有効成分として含む血栓症の予防及び／又は治療剤を提供するものである。本発明の好ましい態様によれば、肝実質細胞増殖因子が下記の理化学的性質：1) SDS-PAGE（非還元条件下）による推定分子量が約76,000～92,000であり；2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有し；3) 80℃、10分間の加熱処理により上記活性が失活し；4) ト

リプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活し；5) ヘパリンに対して強い親和性を有する；を示す上記予防・治療剤が提供される。

【0008】また、本発明の別の態様によれば、肝実質細胞増殖因子あるいは上記の好ましい肝実質細胞増殖因子を有効成分として含む血管内皮細胞の障害を伴う疾患の予防及び／又は治療剤が提供される。この発明の好ましい態様により、上記疾患が、心筋梗塞症及びその後の血流再開通後の組織障害に基づく疾患、経皮的血管形成術及びバイパスグラフト処置後の血管の再閉塞に基づく疾患、末梢動脈血栓症、深部静脈血栓症、脳血栓症、糖尿病性網膜症、腎炎、糸球体腎炎、並びに血栓が器質化することによって生じる動脈硬化症から選ばれる上記予防及び／又は治療剤が提供される。さらに本発明の別の態様によって、肝実質細胞増殖因子あるいは上記の好ましい肝実質細胞増殖因子を有効成分として含む血管内皮細胞の増殖促進剤が提供される。

【0009】本発明の医薬は、肝実質細胞増殖因子(HGF)を有効成分とすることを特徴としている。肝実質細胞増殖因子としては、HGFを含有することの知られているヒトやラット等の哺乳類動物由来の体液や組織、または自発的にHGFを産生する細胞から単離・精製されたものを用いることができるが、遺伝子組換え法によりHGFのcDNAを細胞に導入して得られる組換えHGFを用いることもできる。本発明の医薬の有効成分として、ヒト由来のHGF(hHGF)を用いることが好ましい。

【0010】組換えHGFを産生させる宿主は特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、糸状菌、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞などを用いればよい。より具体的には、HGF生産能を有する形質転換体を製造するには、上記哺乳類由来の胎盤、肝障害患者肝組織及び血液、MRC-5細胞、IMR-9細胞などの線維芽細胞株、好ましくはCHO細胞等の宿主細胞に対して、例えば、特開平3-285693号公報に記載された方法に従ってHGF、好ましくはhHGFをコードするcDNAを含む発現ベクターを導入すればよい。このような形質転換体を培養することにより分離・採取されるHGFを用いることは本発明の好ましい態様である。

【0011】また、本発明の医薬の有効成分として、上記の天然又は組換えHGF自体の他、その前駆体蛋白質や肝実質細胞を増殖させる活性を損なわない範囲で天然HGFの一部のアミノ酸を置換、欠失、挿入、修飾等により改変した非天然型HGFを用いてもよい。このような非天然型HGFとしては、特開平2-288899号公報、PCT国際公開W090/10651号、特開平3-130091号公報、同3-255096号公報、同4-30000号公報、Nature, 342, pp.440-443, 1989等の刊行物に記載のものを用いることができる。

【0012】本発明の医薬の有効成分として特に好ましいHGFは以下の理化学的性質：

- 1) SDS-PAGE（非還元条件下）による推定分子量が約76,000～92,000であり；
 - 2) 肝実質細胞を増殖させる活性を有し；
 - 3) 80℃、10分間の加熱処理により上記活性が失活し；
 - 4) トリプシンによる消化処理及びキモトリプシンによる消化処理により上記活性が失活し；
 - 5) ヘパリンに対して強い親和性を有する
- を示すものである。このようなHGFとしてはヒト由来のものがより好ましく、特開平3-72883号公報又は特開平4-89499号公報に記載のアミノ酸配列により特定されるhHGFが特に好ましい。

【0013】本発明の医薬は、前記HGFの1種または2種以上を単独で、あるいは適当な製剤用添加物と共に製剤形態の医薬組成物として調製し、非経口的に投与することが好ましい。このような医薬組成物の投与形態としては、一般的に非経口的投与に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、注射用アンプル剤や注射用凍結乾燥粉末剤（バイアル充填のもの）などを用いることが可能である。各種製剤形態への調製は、当業界で利用可能な周知の製剤添加物、例えば希釈剤や添加剤などを用い、当業界の慣用の手法に従って行えばよい。

【0014】例えば、注射用凍結乾燥粉末剤は、精製された前記HGFの有効量を注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液などの希釈剤に溶解し、必要に応じてカルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなどの賦形剤、ポリエチレングリコール、デキストラン硫酸ナトリウム、アミノ酸、ヒト血清アルブミンなどの安定化剤、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、フェノールなどの保存剤、ブドウ糖、グルコン酸カルシウム、塩酸プロカインなどの無痛化剤、塩酸、酢酸、クエン酸、水酸化ナトリウムなどのpH調節剤等を加え、常法に従って凍結乾燥することにより製造することができる。

【0015】また、注射用アンプル剤は、前記HGFの有効量を注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液などの希釈剤に溶解し、必要に応じてサリチル酸ナトリウム、マンニトールなどの溶解補助剤、クエン酸ナトリウム、グリセリンなどの緩衝剤、ブドウ糖、添加糖などの等張化剤、上記安定化剤、上記保存剤、上記無痛化剤、上記pH調節剤などの添加剤を加えた後、通常加熱滅菌、無菌濾過などにより無菌化して調製することができる。なお、有効成分の種類によっては加熱滅菌工程で失活する場合があるので、滅菌方法は適宜選択すべきである。

【0016】いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の医薬の有効成分であるHGFは、血管内皮細胞におけるt-PAの産生を促進する作用を有しているので、本発明の医薬は、心筋梗塞症、末梢動脈血栓症、深部静脈血栓症、脳血栓症など各種血栓症の予防及び／又は治療に有効である。また、本発明の医薬の有効成分であるHGFは血管内皮細胞の増殖を促進する作用を有して

いる。血管内皮細胞は血管内壁の抗血栓性の維持に重要な役割を果たしているので、本発明の医薬はこのような作用に基づく血栓症の予防及び／又は治療に有効である。従って、本発明の医薬は、血管内皮細胞が分泌する t-PA による直接的な抗血栓作用と、血管内皮細胞の増殖（血管内壁の修復）に基づく抗血栓作用とを有することとを特徴としており、持続的な抗血栓作用を発揮できるものである。

【0017】さらに、本発明の医薬は、血管内皮細胞の増殖を促進して血管を修復する作用を有しているので、血管内皮細胞に障害を伴う疾患の予防及び／又は治療に有効である。血管内皮細胞に障害を伴う疾患としては、心筋梗塞及びその後の血流再開通後の組織障害に基づく疾患、経皮的血管形成術やバイパスグラフト処置後の血管の再閉塞に基づく疾患、糖尿病性網膜症、腎炎、糸球体腎炎、及び血栓が器質化することによって生じる動脈硬化症等の他、カテーテル留置や血管手術等によって血管内皮細胞が物理的な損傷を受けた場合などを挙げることができる。

【0018】本発明の医薬には、本発明の医薬と同様な薬理作用あるいは他の薬理作用を有する他の医薬の有効成分を配合してもよい。また、本発明の医薬の有効成分の肝実質細胞増殖作用を増強することが知られているヘパリン、デキストラン硫酸等の硫酸化多糖類もしくはその誘導体（特開平5-301824号公報）などの有効成分を配合してもよい。これらの硫酸化多糖類もしくはその誘導体は本発明の医薬の安定性を高める作用を有しているので、これらを配合した医薬は本発明の好ましい態様である。

【0019】本発明の医薬は、ヒトを含む哺乳類の上記の疾患の予防及び／又は治療を目的として、一般的には非経口的に、より具体的には皮下、筋肉または静脈内注射により投与することができる。一般的には、所定量を単回もしくは複数回に分けて注射により投与するか、または点滴などにより連続的に投与することができる。投与量は、患者の年齢、性別、症状、体重、投与形態等に応じて適宜増減すべきであるが、一般的には、成人1日当たり1 μ g/kg～10 mg/kg、より好ましくは10～1000 μ g/kgの範囲で投与すればよい。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。以下の実施例において、HGF として特開平3-285693号公報に記載された方法に従って製造された組換えhHGF(rhHGF)を使用した。

【0021】実施例1：さい帯由来血管内皮細胞の増殖促進作用

ヒトさい帯由来の血管内皮細胞をクラボウ株式会社製のEGM-UV 培地で数回継代して増殖させた後、細胞をトリプシン/EDTA 溶液で剥離し、10% FBS/ペニシリン・スト

レプトマイシン含有 RPMI-1640培地（以下、実施例中でのこの培地を「アッセイ培地」という）で3回洗浄し、アッセイ培地を用いてヌンク社製96ウェルプレートに 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 /100 μ l/ウェルとなるように播種した。HGFを最終濃度が0～200 ng/ml となるように100 μ l/ウェルずつ各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーター中で37℃の条件でインキュベートした。

【0022】2時間後、³H-チミジン0.5 μ Ci/ウェルとなるように各ウェルに添加し、培養をさらに16時間継続した。細胞をトリプシン/EDTA 溶液で剥離後、ファルマシア社製ガラスフィルターに β プレートハーベスター（ファルマシア社製）を用いてハーベストした。細胞を蒸留水で洗浄して細胞内に取り込まれなかった³H-チミジンを除き、フィルターを乾燥した後、シンチレーターを添加して β プレートシンチレーションカウンター（ファルマシア社製）により細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。結果を図1に示す。この結果から、HGF が濃度依存的にさい帯由来血管内皮細胞の増殖を促進することが明らかである。

【0023】実施例2：SV40で不死化したさい帯由来血管内皮細胞のt-PA運動促進作用
SV40で不死化したさい帯由来血管内皮細胞(SV-3T: Agric. Biol. Chem., 55, pp.2487-2453, 1991) をクラボウ株式会社製のEGM-UV培地で数回継代して増殖させた後、アッセイ培地を用いてアッセイを行った。この不死化細胞は通常の培地下で増殖し、HGF の添加による増殖の促進効果はほとんど見られないが、サンドイッチERISA 法で定量可能なt-PA産生能を維持しており、HGF のt-PA産生促進作用を検討するためには優れた系である。

【0024】細胞をトリプシン/EDTA 溶液で剥離後、アッセイ培地で3回洗浄し、アッセイ培地を用いてヌンク社製96ウェルプレートに 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 /100 μ l/ウェルとなるように播種した。HGFを最終濃度が0～200 ng/ml となるように100 μ l/ウェルずつ各ウェルに添加し、CO₂ インキュベーター中で37℃の条件でインキュベートした。48時間後に上清を採取し、その50 μ l を以下のERISA 試験に供した。

【0025】ファルコン社製ウェルプレートにウサギ抗ヒトt-PA IgG 5 μ l/mlを含むリン酸緩衝溶液(PBS) でコーティングし(50 μ l/ウェル)、1% BSA 及びアジ化ナトリウム含有PBS (240 μ l/ウェル) を用いて4℃で1昼夜ブロッキングした。0.39～100 ng/ml の濃度範囲となるように、サンプル及びスタンダード(1% BSA と0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS 中) を37℃で1時間反応させた(50 μ l/ウェル)。1～4 μ g/mlのビオチン化抗ヒトt-PA F(ab')₂ [1% BSAと0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS 中: アマシャム社製ビオチニレーション試薬を用いて抗ヒトt-PA F(ab')₂より作製] を37℃で1時間反応させた(50 μ l/ウェル)。

【0026】1% BSA及びPBS で1,000 倍希釈したカッペ

ル社製 HRPコンジュゲート・アビジンを室温で30分間反応させた。発色試薬 [クエン酸緩衝液 (pH 5.0) 中の OPD 10 mg/25 ml に $10\mu\text{l}$ の過酸化水素水を用時添加したもの。 $50\mu\text{l}$ /ウェル] を加え、適当量の発色が見られた時点で $4\text{N H}_2\text{SO}_4$ ($50\mu\text{l}$ /ウェル) を加えて反応を停止した。650 nm の吸光度及び 490 nm の吸光度の差を測定し、上清中の t-PA 含量を算出した。結果を図 2 に示す。この結果から、HGF が濃度依存的に再帯由来血管内皮細胞の t-PA 産生を促進することが明らかである。

【発明の効果】本発明の医薬の有効成分である HGF は、血管内皮細胞の t-PA 産生を促進するとともに血管内皮細胞の増殖を促進する作用を有しているので、本発明の医

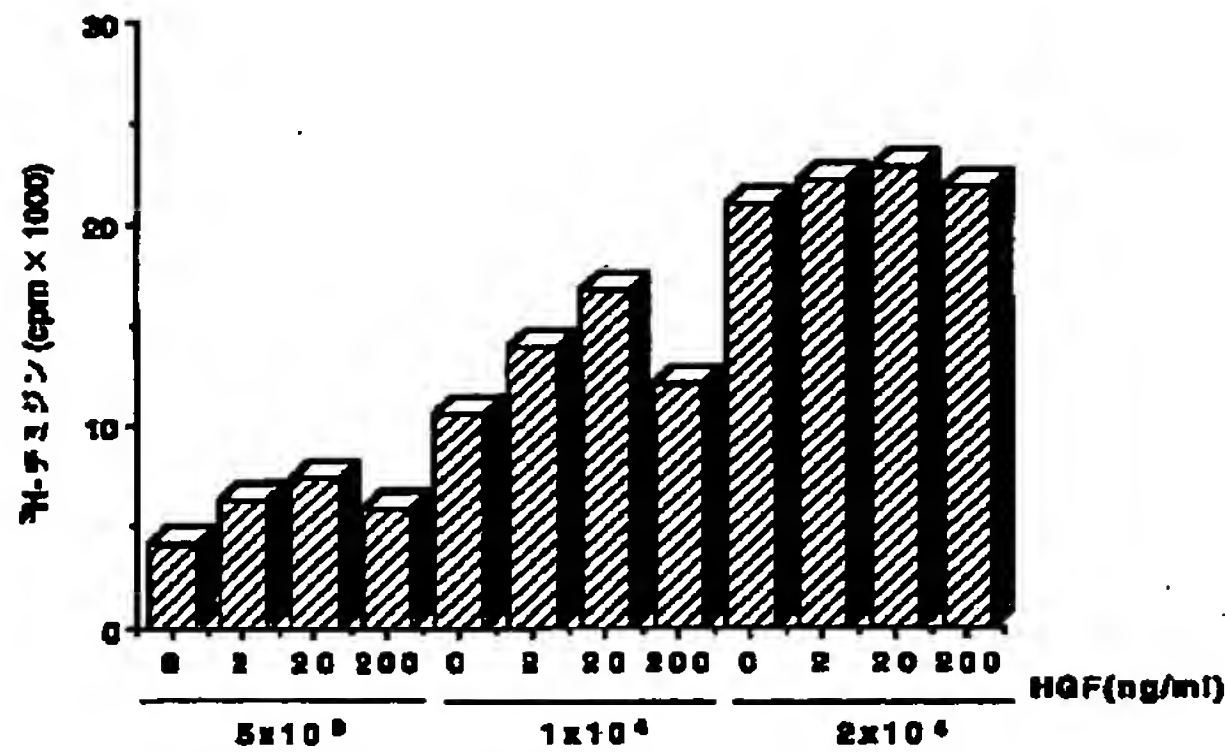
薬は血栓症の予防及び／又は治療、並びに血管内皮細胞に障害を伴う疾患の予防及び／又は治療に有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 さい帯由来血管内皮細胞の増殖に対する HGF の作用を示す図である。図中、横軸はそれぞれ 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 /100 μl /ウェルの細胞数の場合の HGF 濃度 (ng/ml) を示し、縦軸は ^3H -チミジンの取り込み量 (cpm $\times 1,000$) を示す。

【図 2】 さい帯由来血管内皮細胞の t-PA 産生能に対する HGF の作用を示す図である。横軸はそれぞれ 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 /100 μl /ウェルの細胞数の場合の HGF 濃度 (ng/ml) を示し、縦軸は t-PA 産生量 (mg/ml) を示す。

【図 1】



【図 2】

